

## CD34陽性急性白血病細胞における

## DOCK180発現と機能解析

### 学位論文内容の要旨

#### 【背景と目的】

造血幹細胞は多方向に分化する「多分化能」と未分化性を維持したまま増殖する「自己複製能」を有している。骨髄中のニッチと呼ばれる微小環境では内皮細胞や骨芽細胞との接着およびそれらの細胞から産生されるサイトカイン/細胞外マトリックスによって分化、維持、再生が制御されており、それらの生存シグナルが消失するとアポトーシスが誘導される。一方白血病細胞は、サイトカイン依存性の消失とアポトーシスの抑制により自律増殖し、これらの変化を起こす分子機構として様々なシグナル伝達異常が報告されている。その一つに、AML患者から単離したCD34陽性細胞においてはRac活性の亢進を認めたとの報告がある。Racは低分子量G蛋白のひとつであり、インテグリンを介して活性化されアクチン細胞骨格を制御し細胞運動に密接に関わっており、造血幹細胞においてはニッチへのホーミングや生存維持に関わる。RacはGDPがGTPに置換されることで活性化され、この交換反応を触媒する特異的なGEFのひとつに今回検討したDOCKファミリー蛋白と呼ばれる分子群がある。上皮系細胞ではDOCK180が普遍的に発現しており、一方、血液細胞においては相同性を有するDOCK2が特異的に発現し、ノックアウトマウスを用いた研究からDOCK2はリンパ球の遊走に必須であることが報告されている。熊野は正常ヒトCD34陽性細胞にDOCK180が高発現していること、4例のCD34陽性AML細胞においてはDOCK180の発現が低下していることを報告した。そこで本研究では造血幹/前駆細胞とその腫瘍化におけるDOCK180の関与を検討することを目的とし、より多数例の急性白血病症例におけるDOCK180発現量を検討した。さらに、CD34およびDOCK180陽性であり、GM-CSF存在下でのみ生存できる細胞株F-36Pを未分化な造血幹/前駆細胞のモデルとしてDOCK180の機能解析を行った。

#### 【方法と結果】

同意を得て採取した当院および共同研究施設で診断された34例のCD34陽性急性白血病(AML 21例, ALL 8例, MDSから移行した急性白血病; MDS-L 5例)の患者骨髄液から比重遠心法にて単核細胞を分離し、得られた白血病細胞のDOCK180 mRNA発現量をリアルタイム定量RT-PCR法で検討した。各サンプルのDOCK180 mRNAおよびDOCK2 mRNAの発現量はGAPDH mRNAの発現量で補正後、DOCK180では293T細胞の発現量を1000 Unitsに、DOCK2ではJurkat細胞の発現量を1000 Unitsに規定して、それに対する相対量として数値化した。AMLでは中央値29 Units(1-1488 Units, n=21), ALLでは3 Units(0-141 Units, n=8)であり、正常ヒトCD34陽性細胞における1135 Units(635-2840 Units, n=12)と比較して有意に低値であった。一方、MDS-Lでは中央値147 Units(7-4346 Units, n=5)であり、正常CD34陽性細胞と有意差を認めなかった。なお、ALLはAMLと比較し有意に低値であった。一方、DOCK2 mRNAはいずれも高発現しており各群に有意差を認めなかった。化学療法によって完全寛解(CR)に至った9例(AML 6例, ALL 3例)について、骨髄CD34陽性分画をソーティングにより純化し、そのDOCK180 mRNA発現量を検討した。白血病発症時のCD34陽性白血病細胞において低値であったDOCK180 mRNA発現量は、CR時

の骨髓CD34陽性細胞分画において全例で発現量の増加を認めた。また、臨床経過を観察し得た4例のうち、治療後寛解を維持していた2例では、初診時に低値であったDOCK180 mRNA発現量はCR時には正常CD34陽性細胞と同程度まで上昇し、その後もその発現を維持していた。一方、他の2例ではCR時には一時DOCK180 mRNA発現量の増加を認めたが、再発時には初診時と同程度に低下していた。次に、レンチウイルスベクターを用いてF-36PにRNAiを導入し、DOCK180ノックダウン細胞および配列の異なるshRNAを導入した2種類のDOCK2ノックダウン細胞を作成した。これらの各種ノックダウン細胞をGM-CSF非存在下で培養し、フローサイトメトリー法を用いて生存率を経時的に観察した。ランダムな配列をもつベクターを導入したMOCK細胞およびDOCK2ノックダウン細胞では培養3日目にはその生存率は45%程度となったが、DOCK180ノックダウン細胞では3日目でも80%と有意に高い生存率を維持した。さらに、エレクトロポレーション法を用いてF-36PへDOCK180に対する2種類の異なるsiRNAを導入し、一過性DOCK180ノックダウン細胞を作成した。これらの細胞を用い、GM-CSF非存在下での各細胞における生存率をフローサイトメトリー法により検討した。培養3日目における陰性コントロール細胞の生存率は1日目と比較し10%程度低下したが、DOCK180ノックダウン細胞ではそれぞれ5%および3%程度に留まり、陰性コントロール細胞と比較して有意に生存が維持された。

### 【考察】

本研究の結果によりDOCK180は新しいCD34陽性急性白血病のマーカーとなる可能性が示唆され、長期予後と関連し治療方針の決定に重要な意味をもつ微小残存病変 (Minimal residual disease:MRD) のマーカーとしてDOCK180 mRNAの発現量をモニタリングすることで、白血病の再燃を検出できる可能性も考えられる。同じCD34陽性急性白血病の中でも、ALLとAMLでDOCK180 mRNAの発現量に有意差を認めたことはCD34陽性急性白血病において骨髓系白血病とリンパ系白血病のDOCK180が関連した分子生物学的な違いを反映している可能性がある。DOCK2はリンパ球の遊走とリンパ球系細胞の造血において必須であるが、より未熟な幹細胞の自己複製能や骨髓球系細胞への分化には必須ではないことが報告されている。これらのことから、リンパ球系細胞の重要なGEFはDOCK2であり、DOCK180の発現および役割が必須ではないと想定される。さらに、一部で分化能を保持した前白血病的疾患であるMDS-Lの白血病細胞が正常CD34陽性細胞とAML細胞の中間のDOCK180発現量を持つことはDOCK180発現と分化能との関連を考えるうえで極めて興味深い。今回の検討ではF-36P細胞の生存に重要なのはDOCK180であり、DOCK180発現が低下することでサイトカイン非依存的生存、すなわち白血病化につながる可能性が示唆された。このことは、これまで細胞の運動性に関与する報告が大部分であったDOCK180を介したシグナル伝達経路の機能に、生存シグナルの制御という新たな生物学的機能が存在することを示唆している。実際、急性白血病では増殖の亢進と分化の停止の他に、アポトーシスの制御異常が知られている。一方、MDSでは細胞の増殖とアポトーシスがともに亢進しており、それが無効造血の一因であることが報告されている。したがって、DOCK180の発現量と化学療法による腫瘍細胞のアポトーシス、すなわち治療効果に相関が見られる可能性が示唆されるが、実際には今回の検討で治療抵抗性の経過を示したAML3例中2例ではDOCK180 mRNA発現量が高値であり、一般に化学療法不応で予後不良であるMDS-LにおいてもDOCK180が高発現していた。このことはDOCK180の発現が生存シグナルの制御とは異なる機序で治療抵抗性の因子となっている可能性を示唆している。今回の研究で、CD34陽性急性白血病におけるDOCK180発現の意義が明らかとなった。急性白血病発症のメカニズムを理解するための一助となる知見と考えられ、さらなる研究と機序の解明が期待される。

### 【結語】

1. CD34 陽性急性白血病細胞では DOCK180 の発現がヒト正常 CD34 陽性細胞と比較し有意に低下していた。
2. CD34 陽性急性リンパ性白血病における DOCK180 発現は CD34 陽性急性骨髓性白血病と比べて有意に低下していた。
3. RNAi 法を用いて F-36P 細胞の DOCK180 発現を抑制した結果 GM-CSF 依存性を失い自律的生存を認めた。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 池 隆 夫

副 査 教 授 今 村 雅 寛

副 査 教 授 秋 田 弘 俊

学 位 論 文 題 名

## CD34陽性急性白血病細胞における DOCK180発現と機能解析

DOCK180 は DOCK ファミリー蛋白の一つであり、低分子量 G 蛋白 Rac の GDP から GTP への交換反応を触媒することで Rac を活性化し細胞運動、貪食および接着に関わる分子である。DOCK180 は上皮系細胞に普遍的に発現し、一方血液細胞では相同性を有する DOCK2 が特異的に発現している。正常ヒト CD34 陽性細胞に DOCK180 が高発現していること、4 例の CD34 陽性 AML 細胞においては DOCK180 の発現が低下していることが報告されている。そこで本研究では造血幹/前駆細胞とその腫瘍化における DOCK180 の関与を検討することを目的とし、より多数例の急性白血病症例における DOCK180 発現量を検討した。さらに、CD34 および DOCK180 陽性であり、外因性サイトカイン存在下でのみ生存できる細胞株 F-36P を未分化な造血幹/前駆細胞のモデルとして DOCK180 の機能解析を行った。

34 例の CD34 陽性急性白血病細胞 (AML 21 例、ALL 8 例、MDS から移行した急性白血病 ; MDS-L 5 例) における DOCK180 mRNA 発現量をリアルタイム定量 RT-PCR 法を用いて検討した。AML と ALL では正常ヒト CD34 陽性細胞と比較して DOCK180 mRNA 発現量がいずれも有意に低値であったが、MDS-L では有意差を認めなかった。なお、ALL は AML と比較し有意に低値であった。一方、DOCK2 mRNA はいずれも高発現しており各群に有意差を認めなかった。治療後寛解期の 9 例における骨髄 CD34 陽性細胞の DOCK180 mRNA 発現量は白血病発症時と比較し全例で発現量の増加を認めた。また、臨床経過を観察し得た 4 例のうち治療後寛解を維持していた 2 例では、寛解期に DOCK180 mRNA 発現量が増加した後もその発現を維持していた。一方、他の 2 例では再発時には DOCK180 mRNA 発現量が初診時と同程度まで低下していた。

次に、レンチウイルスベクターを用いて F-36P に RNAi を導入し、DOCK180 ノックダウン細胞および DOCK2 ノックダウン細胞を作成した。これらの細胞を GM-CSF 非存在下で培養し、フローサイトメトリー法を用いて生存率を経時的に観察した。DOCK180 ノックダウン細胞は、MOCK 細胞および DOCK2 ノックダウン細胞と比較し、培養 3 日目でも有意に高い生存率を維持した。さらに、エレクトロポレーション法を用いて一過性 DOCK180 ノックダウン細胞を作成した。これらの細胞を用い、GM-CSF 非存在下での各細胞における生存率をフローサイトメトリー法により検討したところ、培養 3 日目には陰性コントロール細胞と比較し DOCK180 ノックダウン細胞で有意に生存率が維持された。

以上の結果から、DOCK180はCD34陽性細胞において生存シグナルの制御という新たな生物学的機能を有し、DOCK180の発現が低下することで白血病化につながる可能性が示唆された。さらに、DOCK180はCD34陽性急性白血病の新たなマーカーとなり得、DOCK180 mRNA発現量をモニタリングすることでMRD検出に有用であると考えた。

質疑応答では、副査の今村雅寛教授からCD34陽性急性骨髄性白血病細胞において病型間、すなわち細胞起源の違いでDOCK180 mRNA発現量に差が認められないことに対する生物学的理由、骨髄異形成症候群から移行した白血病細胞におけるDOCK180 mRNA発現量の程度と白血病細胞の性状との相関関係の有無、および急性白血病発症時のDOCK180発現量の違いが治療効果を予測する因子となりうるかについて、さらに急性白血病の臨床検体におけるサイトカイン依存性消失の検討の有無についての質問があった。次いで副査の秋田弘俊教授から骨髄系とリンパ系の白血病細胞におけるDOCK180 mRNA発現量の差と分子生物学的差異について、DOCK180の下流で細胞の生存やアポトーシスに直接関わるエフェクター分子に関するデータあるいは文献的報告の有無について、および白血病幹細胞とDOCK180発現との関連についての質問があった。最後に主査の小池隆夫教授より白血病細胞においてDOCK180発現を低下させる機序、MRDを検出するための汎用性のある手法の有無、についての質問があった。いずれの質問に対しても、申請者は過去の文献報告や未発表であった実験結果などを引用し、概ね適切に回答した。

この論文は、CD34陽性急性白血病におけるDOCK180発現の意義を明らかにし、急性白血病発症のメカニズムを理解する一助となる点で高く評価され、白血病に至る機序の今後のさらなる解明と新たな白血病マーカーとしての臨床応用が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。